

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2005年3月17日 (17.03.2005)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2005/023282 A1(51) 国際特許分類: A61K 38/00, 9/06, 9/10, 9/12, 9/14,  
9/70, 9/72, 47/02, 47/04, 47/12, 47/16

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/012718

(22) 国際出願日: 2004年9月2日 (02.09.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

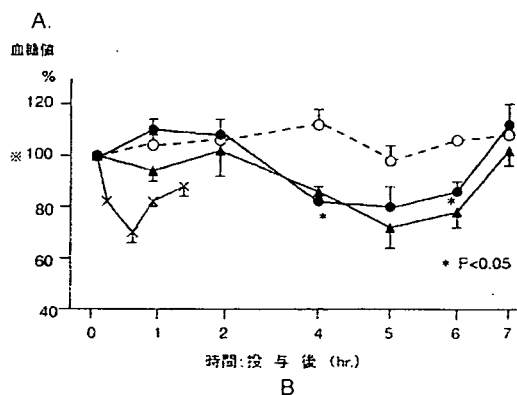
(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2003-312031 2003年9月3日 (03.09.2003) JP(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社  
LITバイオファーマ (LIT BIO-PHARMA CO.,  
LTD.) [JP/JP]; 〒1056201 東京都港区愛宕2丁目5番  
1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 水島 裕  
(MIZUSHIMA, Yutaka) [JP/JP]; 〒1060032 東京都港  
区六本木6丁目12-3-2402 Tokyo (JP). 上野  
幸生 (UENO, Yukio) [JP/JP]; 〒2210854 神奈川県横浜  
市神奈川区三ツ沢南町7-40 Kanagawa (JP). 山口  
菜子 (YAMAGUCHI, Yoko) [JP/JP]; 〒2580022 神奈川  
県足柄上郡開成町牛島27-17 Kanagawa (JP). 五十嵐  
理慧 (IGARASHI, Rie) [JP/JP]; 〒2140036 神奈川  
県川崎市多摩区南生田5丁目8-2 Kanagawa (JP).  
鈴木 潤 (SUZUKI, Jun) [JP/JP]; 〒3360024 埼玉県さい  
たま市南区根岸2丁目16-2-209 Saitama (JP).  
石原 務 (ISHIHARA, Tsutomu) [JP/JP]; 〒1430024 東  
京都大田区中央5丁目24-14-101 Tokyo (JP).

/続葉有/

(54) Title: NANOPARTICLE CONTAINING PHYSIOLOGICALLY ACTIVE PROTEIN OR PEPTIDE, PROCESS FOR PRO-  
DUCING THE SAME AND EXTERNAL PREPARATION COMPRISING THE NANOPARTICLE(54) 発明の名称: 生理活性タンパク質またはペプチドを含有するナノ粒子およびその製造方法、ならびに当該ナノ  
粒子からなる外用剤

A... BLOOD GLUCOSE LEVEL

B... TIME (hr.) AFTER ADMINISTRATION

(57) Abstract: It is intended to provide a nanoparticle containing a physiologically active protein or peptide which is excellent in the absorbability of the physiologically active protein or peptide *in vivo*, exerts a high bioavailability and shows a prolonged effect when transdermally or transmucosally administered. More specifically, a nanoparticle containing a physiologically active protein or peptide which is obtained by making the physiologically active protein or peptide insoluble in water, producing a primary nanoparticle by using the water-insoluble matter, a medium/long-chain organic compound having both of a hydrophobic group and an anionic residue and a surfactant, and then bringing the primary nanoparticle into contact successively with a divalent or trivalent metal salt and a divalent or trivalent basic salt; and an external preparation comprising the nanoparticle as the active ingredient.

(57) 要約: 生理活性タンパク質またはペプチドについて、皮膚ならびに粘膜経由の投与方法により、生体内への吸収性に優れ、高いバイオアベイラビリティを発揮し、その効果の持続性を有するものである、生理活性タンパク質またはペプチドを含有するナノ粒子を提供する。

/続葉有/



(74) 代理人: 草間 攻 (KUSAMA, Osamu); 〒1020082 東京都千代田区飯田橋4丁目5番12号 岩田ビル7階  
草間特許事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

具体的には、生理活性タンパク質またはペプチドを水不溶体とし、当該水不溶体、疎水基と陰イオン残基を併せもつ中長鎖有機化合物および界面活性剤を用いて一次ナノ粒子を作製し、当該一次ナノ粒子を2価または3価の金属塩、および2価または3価の塩基性塩と順次接触させることにより得られる生理活性タンパク質またはペプチドを含有するナノ粒子であり、また当該ナノ粒子を有効成分として含有する外用剤である。

## 明 細 書

生理活性タンパク質またはペプチドを含有するナノ粒子およびその製造方法、ならびに当該ナノ粒子からなる外用剤

### 技術分野

[0001] 本発明は、生理活性タンパク質またはペプチドを含有するナノ粒子に関し、さらに詳細には、生理活性タンパク質またはペプチドを含有するナノ粒子およびその製造方法、ならびに当該ナノ粒子からなる外用剤に関する。

### 背景技術

[0002] バイオテクノロジー、ヒトゲノム解析の進歩により、生理活性タンパク質の医薬品としての重要性がますます高くなってきている。生理活性タンパク質は高分子で吸収が悪く、消化管に存在するペプチダーゼによる不活性化を受けるため、経口投与することができず、通常注射により体内投与が行われている。しかしながら、このような方法は、患者にとって注射部位での疼痛を与え、好ましいものではない。また、通常の間隔で投与を行う場合には、患者に著しい不便を与えることとなる。したがって安全、かつ頻回に投与するためには簡便であり、自己投与可能な非注射投与方法の開発が望まれている。

[0003] 近年、注射によらず皮膚、粘膜などから生理活性タンパク質を活性体のまま高濃度で生体内吸収させる技術の開発が、治療学的研究、特にDDS (ドラッグ・デリバリー・システム) 研究における重要なテーマの一つとなっている。しかしながら、ヒトへの吸収性、生物学的利用率 (バイオアベイラビリティ) においては、未だ満足する結果は得られておらず、生理活性タンパク質について、皮膚、粘膜経由の投与方法、特に経皮吸収投与方法はほとんど成功していないのが現状である。

[0004] 事実、生理活性タンパク質の一つとして、比較的低分子で、しかも化学的に安定なインスリンを用いて皮膚、粘膜経由の投与方法について種々の研究が行われているが、その吸収率は、皮膚、消化器粘膜、気道粘膜の順で高くなっているものの、それでも粘膜経由の投与での吸収率は、確実なデータでは、数パーセントにすぎず、皮膚経由の投与ではほとんど吸収されないとされている (非特許文献1)。

[0005] また、生理活性タンパク質をカルシウム含有水難溶性無機物粒子に封入した製剤(特許文献1)、生理活性タンパク質あるいはペプチドと亜鉛イオンとの沈殿物による水不溶性徐放性組成物(特許文献2)などが提案されている。しかしながら、これらの製剤は、薬物の吸収性、あるいは局所刺激等の点で十分なものとは言い難く、未だ実用化に至ったものはない。また、本発明が目的とする生理活性タンパク質またはペプチドを含有するナノ粒子を用いて皮膚、粘膜経路により生体内吸収させようとする技術については、これまで知られているものではない。

[0006] 特許文献1:国際公開 WO 02/096396号公報

特許文献2:特開2003-081865号公報

非特許文献1:DRUG DELIVERY SYSTEM 今日のDDS 薬物送達システム(医薬ジャーナル社)325-331頁、1999年

非特許文献2:臨床薬理(Jpn. J. Clin. Pharmacol. Ther.,)26(1), p.127-128(1995)

非特許文献3:Yakugaku Zasshi, 121(12), p.929-948 (2001)

非特許文献4:J. Controlled Release, 79, p.81-91 (2002)

[0007] 上述したように、生理活性タンパク質は、経口投与ではその薬効を発揮することができず、主に注射投与によるものである。したがって、患者への注射による苦痛感を解除し、自己投与が可能な投与方法の簡便化のためには、注射投与に代わる非経口投与手段として皮膚、粘膜経路の投与方法が効果的ではあるが、未だ吸収性、バイオアベイラビリティにおいて満足するものはなく、高い生体内吸収性および生物学的利用率を有する薬剤の出現が、医療の現場で強く望まれているのが現状である。

#### 発明の開示

#### 発明が解決しようとする課題

[0008] したがって本発明は、これまで経口投与ではその薬効を発揮することができず、主に注射投与がなされてきた生理活性タンパク質またはペプチドについて、皮膚ならびに粘膜経路の投与方法により、生体内への吸収性に優れ、高いバイオアベイラビリティを発揮し得る技術を提供することを課題とする。

[0009] かかる課題を解決するべく、本発明者らは鋭意検討した結果、ナノテクノロジーを応

用し、赤血球よりも遥かに小さい、特殊なナノ粒子を利用し、そこに生理活性タンパク質またはペプチドを含有させることに成功し、かくして得られたナノ粒子を、皮膚ならびに粘膜経路による投与を行った場合、ナノ粒子に含有された生理活性タンパク質またはペプチドの生体内への高い吸収性が得られ、バイオアベイラビリティが優れたものであることを見だし、本発明を完成させるに至った。

#### 課題を解決するための手段

[0010] したがって本発明は、皮膚または粘膜投与により優れた吸収性、バイオアベイラビリティを有する、生理活性タンパク質またはペプチドを含有するナノ粒子を提供する。

より具体的には、本発明は、

(1) 生理活性タンパク質またはペプチドを水不溶体とし、当該水不溶体、疎水基と陰イオン残基を併せもつ中長鎖有機化合物および界面活性剤を用いて一次ナノ粒子を作製し、当該一次ナノ粒子を2価または3価の金属塩、および2価または3価の塩基性塩と順次接触させることにより得られる生理活性タンパク質またはペプチドを含有するナノ粒子、

(2) 一次ナノ粒子が、水不溶体、疎水基と陰イオン残基を併せもつ中長鎖有機化合物および界面活性剤を有機溶媒または含水有機溶媒に溶解または懸濁し、これを多量の水に分散しながら加えることにより作製されるものである(1)に記載のナノ粒子、

(3) 粒子の直径が1～150nmである(1)または(2)に記載のナノ粒子、

(4) 粒子の直径が10～80nmである(1)または(2)に記載のナノ粒子、

(5) 生理活性タンパク質またはペプチドが、インスリン、インターフェロン- $\alpha$ 、インターフェロン- $\beta$ 、インターフェロン- $\gamma$ 、成長ホルモン、G-CSF、GM-CSF、エリスロポエチン、トロンボポエチン、ウロキナーゼ、t-PA、IL-11、エタネルセプト、インフリキシマブ、SOD、FGF、EGF、HGF、NGF、BDNF、レプチン、NT-3、抗原、抗体、酵素、カルシトニン、PTH、ACTH、GnRH、TRHおよびバソプレシンから選択されるものである(1)～(4)に記載のナノ粒子、

(6) 生理活性タンパク質またはペプチドを水不溶体とする手段が、2価または3価の

金属イオンとの接触、酸性または塩基性多糖体との接触、pHの調整またはイオン強度の変化のいずれかの手段である(1)に記載のナノ粒子、

(7)生理活性タンパク質またはペプチドを水不溶体とするために接触させる2価または3価の金属イオンが、亜鉛イオン、カルシウムイオン、鉄イオンおよび銅イオンから選択されるものである(6)に記載のナノ粒子、

(8)疎水基と陰イオン残基を併せもつ中長鎖有機化合物が、ミリスチン酸、オレイン酸、ラウリン酸、パルミチン酸およびそれらの塩から選択されるものである(1)ないし(4)に記載のナノ粒子、

(9)一次ナノ粒子に接触させる2価または3価の金属塩がカルシウム塩、亜鉛塩、鉄塩または銅塩であり、2価または3価の塩基性塩が炭酸塩、リン酸塩、シュウ酸塩、乳酸塩または尿酸塩である(1)ないし(4)に記載のナノ粒子、

(10)上記(1)ないし(9)のいずれかに記載のナノ粒子からなることを特徴とする皮膚または粘膜用外用剤、

(11)外用剤が、軟膏剤、ゲル剤、点鼻剤、点眼剤、噴霧剤、吸引剤、懸濁剤、パップ剤、貼付剤および口腔粘膜用錠剤から選択されるものである(10)に記載の外用剤、

(12)生理活性タンパク質またはペプチドを水不溶体とし、当該水不溶体、疎水基と陰イオン残基を併せもつ中長鎖有機化合物および界面活性剤を有機溶媒または含水有機溶媒に溶解または懸濁し、この溶液を多量の水に分散しながら加えることにより一次ナノ粒子を作製し、当該一次ナノ粒子含有溶液に2価または3価の金属塩、および2価または3価の塩基性塩を順次加えることを特徴とする生理活性タンパク質またはペプチドを含有するナノ粒子の製造方法、

(13)生理活性タンパク質またはペプチドを水不溶体とする手段が2価または3価の金属イオンとの接触であり、一次ナノ粒子に接触させる2価または3価の金属塩がカルシウム塩であり、2価または3価の塩基性塩が炭酸塩である(12)に記載のナノ粒子の製造方法、

(14)金属イオンが亜鉛イオンである(13)に記載のナノ粒子の製造方法、  
を提供するものである。

## 発明の効果

- [0011] 本発明が提供するナノ粒子は、そこに含有される生理活性タンパク質またはペプチドを皮膚または粘膜経由により生体内吸収させるものであり、注射投与に代わり得る生体内吸収性を示すものである。したがって、これまで達成されていなかった生理活性タンパク質またはペプチドの経皮または経粘膜による生体内吸収を可能にする画期的な効果を有し、高吸収性の生理活性タンパク質およびペプチドを含有する外用剤が創製される、優れた効果を有する。

## 図面の簡単な説明

- [0012] [図1]試験例1におけるマウスの血糖値の推移を示す図である。図中○はコントロール0  $\mu\text{g}$ /匹、●は経皮投与ナノ粒子10  $\mu\text{g}$ /匹、▲は経粘膜投与ナノ粒子10  $\mu\text{g}$ /匹、×は通常インシュリン投与1  $\mu\text{g}$ /匹を表しており、血糖値の平均値は430mg/100mLである。

## 発明を実施するための最良の形態

- [0013] 本発明は、上記するように、生理活性タンパク質またはペプチドを水不溶体とし、当該水不溶体、疎水基と陰イオン残基を併せもつ中長鎖有機化合物および界面活性剤を用いて一次ナノ粒子とし、次いで、当該一次ナノ粒子を2価または3価の金属塩、および2価または3価の塩基性塩を順次接触させることにより得られる生理活性タンパク質またはペプチドを含有するナノ粒子、その製造方法、および当該ナノ粒子からなる外用剤である。
- [0014] 本発明のナノ粒子は、その直径は1〜150nm程度であり、好ましくは10〜80nm程度である。かかる粒子径は、含有させる生理活性タンパク質またはペプチドの水不溶体と中長鎖有機化合物との配合量比率、使用する溶媒の量、攪拌の強度によって調整することができ、直径5〜500nm程度の粒子を作製することができる。なお、中長鎖有機化合物の配合量を多くすると、粒子径が小さなものとなることが判明した。粒子径の測定は、光散乱法あるいは電子顕微鏡下で測定することができる。
- [0015] 本発明が提供するナノ粒子に含有される生理活性タンパク質またはペプチドとしては、特に限定されないが、2価または3価の金属塩により沈澱物を形成するものが好ましい。そのような生理活性タンパク質またはペプチドとしては、インスリン、インターフ

エロン $\alpha$ 、インターフェロン $\beta$ 、インターフェロン $\gamma$ 、成長ホルモン、G-CSF、GM-CSF、エリスロポエチン、トロンボポエチン、ウロキナーゼ、t-PA、IL-11、エタネルセプト、インフリキシマブ、SOD、FGF、EGF、HGF、NGF、BDNF、レプチン、NT-3、抗原、抗体、各種酵素、カルシトニン、PTH、ACTH、GnRH、TRHまたはバソプレシンをあげることができる。その中でも、インスリン、インターフェロン $\alpha$ 、インターフェロン $\beta$ 、インターフェロン $\gamma$ 、ヒト成長ホルモン、エリスロポエチンが特に好ましいものである。

[0016] 本発明のナノ粒子を製造する場合において、最初に生理活性タンパク質またはペプチドを水不溶体とする。この水不溶体とする手段として最も好ましいものは、生理活性タンパク質またはペプチドと沈澱物を形成する2価または3価の金属イオンを使用することである。そのような2価または3価の金属イオンとしては、塩化亜鉛、硫酸亜鉛、酢酸亜鉛などの亜鉛塩による亜鉛イオン；塩化カルシウム、硫酸カルシウム、炭酸カルシウムなどのカルシウム塩によるカルシウムイオン；塩化鉄、硫化鉄などの鉄塩による鉄イオン；塩化銅、硫酸銅などの銅塩による銅イオン等をあげることができ、なかでも亜鉛イオンを好ましく使用することができる。

[0017] この場合の生理活性タンパク質またはペプチドと2価または3価の金属イオンとの配合比は特に限定されず、両物質が結合することにより水不溶体が生じるに十分な比率であればよい。例えば、亜鉛イオンの場合には、生理活性タンパク質またはペプチドと亜鉛塩とを、重量比で10:1〜1:2程度とするのがよい。その他の水不溶化方法として、コンドロイチン硫酸ナトリウム、ヒアルロン酸、キトサンなどの酸性または塩基性多糖体と接触させること、あるいは生理活性タンパク質またはペプチドを溶解した溶液のpH調節、イオン強度の変化などにより行うことも可能である。なお、生理活性タンパク質またはペプチド自体が水不溶性である場合には、そのまま使用することができる。

[0018] 本発明のナノ粒子を製造するためには、疎水基と、カルボキシル基、リン酸基、硫酸基などの陰イオン残基を併せもつ化合物を配合する必要がある。そのような疎水基と陰イオン残基を併せもつ有機化合物であればどのようなものでも使用することができるが、なかでもカルボキシル基を有する中長鎖有機化合物が特に好ましい。その



ような中鎖有機化合物としては、ミリスチン酸、オレイン酸、ラウリン酸、パルミチン酸が好ましい。中鎖有機化合物は粉末である場合にはそのまま加えることが可能であるが、有機溶媒または含水有機溶媒中に溶解して使用するのが好ましい。そのような有機溶媒としては、アセトン、メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノールなどの低級アルコールが使用でき、なかでもアセトン、エタノールが好ましい。なお、生理活性タンパク質またはペプチドと中鎖有機化合物との配合重量比は、1:0.5〜1:0.03程度とするのが好ましい。

[0019] 本発明のナノ粒子を製造するに際しては、生成したナノ粒子同士の凝集を避けるために、適量の界面活性剤を添加するのが好ましく、その配合量はナノ粒子同士が凝集しない程度で適宜選択することができ、中鎖有機化合物に対しモル比で0.3〜0.03程度使用するのがよい。そのような界面活性剤としては、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、ポリエチレングリコール脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル(Tweenシリーズ)、ポリオキシエチレン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ソルビタン脂肪酸エステル、グリセリン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコールなどの非イオン性界面活性剤を使用することができ、なかでもポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル(Tweenシリーズ)が好ましい。

[0020] 本発明の最も重要な特徴は、生理活性タンパク質またはペプチドを水不溶体とし、当該水不溶体、中鎖有機化合物および界面活性剤を用いることにより、一次ナノ粒子を作製した後、当該一次ナノ粒子を2価または3価の金属塩、および2価または3価の塩基性塩と順次接触させることにより、金属塩と塩基性塩が順次結合して、結果的に一次ナノ粒子の周囲を水不溶性の金属塩が覆う状態を有する結合体とすることである。

[0021] かくして得られた結合体自体が、本発明が目的とするナノ粒子そのものであり、驚くべきことに、このナノ粒子を経皮、経粘膜投与した場合に、当該ナノ粒子がキャリアとして作用し、そこに含有された生理活性タンパク質またはペプチドを良好に生体内吸収させるものであり、その生体内吸収性は高く、注射投与に代わり得るものとなる。

[0022] 使用される2価または3価の金属塩としては、塩化カルシウム、酢酸カルシウム、硫

酸カルシウムなどのカルシウム塩;酢酸亜鉛、塩化亜鉛、硫酸亜鉛などの亜鉛塩;塩化鉄、硫化鉄などの鉄塩;または塩化銅、硫化銅などの銅塩であり、なかでもカルシウム塩、特に塩化カルシウムが好ましい。金属塩の配合量は一概に限定し得ないが、有効成分となる生理活性タンパク質またはペプチドに対し、重量比で3〜0.01程度であるのが好ましい。

[0023] また、2価または3価の塩基性塩としては、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、炭酸カルシウムなどの炭酸塩;リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、リン酸カルシウムなどのリン酸塩;シュウ酸ナトリウム、シュウ酸カリウム、シュウ酸カルシウムなどのシュウ酸塩;乳酸ナトリウム、乳酸カリウム、乳酸カルシウムなどの乳酸塩;尿酸ナトリウム、尿酸カリウム、尿酸カルシウムなどの尿酸塩などであり、なかでも炭酸塩、特に炭酸ナトリウムが好ましい。塩基性塩の配合量は一概に限定し得ないが、上記の金属塩に対し、モル比で1.0〜0.05程度であるのが好ましい。

[0024] 以下に、本発明が提供するナノ粒子の製造方法について、説明する。

先ず、生理活性タンパク質またはペプチドを酸性、塩基性または中性の水に溶解し、その溶液に2価または3価の金属イオンを加え、生理活性タンパク質またはペプチドを水不溶体とする。この懸濁液に、中長鎖有機化合物と界面活性剤を有機溶媒あるいは含水有機溶媒に溶解した液を加え、溶解または懸濁させ、この溶液を多量の水に分散しながら加える。この溶液を1〜30分間程度攪拌することにより、一次ナノ粒子が作製される。かくして作製された一次ナノ粒子を含有する溶液に、2価または3価の金属塩を加え、1〜30分間攪拌し、次いで2価または3価の塩基性塩を加え、1〜30分攪拌することにより本発明のナノ粒子を製造することができる。

[0025] かくして製造された本発明の生理活性タンパク質またはペプチドを含有するナノ粒子の溶液を凍結乾燥、減圧乾燥、噴霧乾燥等することにより溶媒を除去し、製剤用組成物として、適宜製剤基剤、添加剤等を使用することにより、所望の外用剤を調製することができる。

[0026] 本発明は、また、そのような生理活性タンパク質またはペプチドを含有するナノ粒子を有効成分として含有する皮膚、粘膜用の外用剤を提供するものでもある。そのような外用剤としては、全身および局所投与・治療を目的として局所へ塗布、貼付、滴下

、噴霧などの形態で投与し得るものであり、具体的には、軟膏剤、ゲル剤、点鼻剤、点眼剤、噴霧剤、吸引剤、懸濁剤、パップ剤、貼付剤、口腔粘膜用錠剤等をあげることができる。皮膚または粘膜への塗布、上気道への噴霧などが有効な投与形態である。

[0027] これらの外用剤の調製に使用される基剤、その他の添加剤成分としては、製剤学的に外用剤の調製に使用されている基剤、成分をあげることができる。具体的には、ワセリン、プラスチベース、パラフィン、流動パラフィン、軽質流動パラフィン、サラシミツロウ、シリコン油などの油脂性基剤；水、マクロゴール、エタノール、メチルエチルケトン、綿実油、オリーブ油、落花生油などの溶剤；ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、グリセリン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコールなどの非イオン性界面活性剤；ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロースナトリウム(CMC)、キサンタンガム、トラガントガム、ゼラチン、アラビアガム、アルブミンなどの増粘剤；ジブチルヒドロキシトルエンなどの安定化剤；グリセリン、1, 3-ブチレングリコール、プロピレングリコール、尿素、ショ糖、エリスリトール、ソルビトールなどの保湿剤；パラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸ブチル、デヒドロ酢酸ナトリウム、p-クレゾールなどの防腐剤等であり、剤型に応じて適宜選択して使用することができる。

[0028] 例えば、本発明のナノ粒子を有効成分として含有する軟膏剤の場合には、基剤等の成分としてワセリンを使用し、ハイドロゲル剤として懸濁安定化するために0.05〜0.5%のカルボキシメチルセルロースナトリウム(CMC)と一緒に使用するのがよい。点鼻剤としては、局所滞留性を高めるために、ヒドロキシプロピルセルロース(HPC)の高分子量タイプを使用するのが好ましい。

[0029] 本発明を、以下の実施例、試験例によりさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

[0030] 実施例1:

インスリン1mg(21 IU)を、0.01N塩酸100  $\mu$ Lに溶解した。この溶液に塩化亜鉛0.4mgを加え、次いで、ミスチン酸6.5mgをアセトン100  $\mu$ Lに溶解しさらに水

30  $\mu$  Lを加えた溶液のうち10  $\mu$  Lを加えた。この溶液に2  $\mu$  LのTween80を加え、蒸留水98  $\mu$  Lを加えて攪拌した。以上の混合液を5mLの蒸留水に加え、よく攪拌することにより、一次ナノ粒子を作製した。この溶液に5M塩化カルシウム水溶液15  $\mu$  Lを加え、30分間攪拌し、さらに1M炭酸ナトリウム水溶液15  $\mu$  Lを加えて5分間攪拌し、30分間放置することにより、ナノ粒子(本発明のナノ粒子)を作製した。このナノ粒子を含む溶液を一夜凍結乾燥した。得られたナノ粒子について光散乱法ならびに電子顕微鏡による粒度観察をしたところ、大部分の粒子の直径が10～90nmであり、60nmのものが最も多く存在していた。

- [0031] このナノ粒子を用い、ワセリンあるいは1%CMC水溶液に所定量のインスリン量を再分散させ、混和して軟膏またはゾルを得た。

以上のようにして製造された軟膏またはゾル(以下「本製剤」という場合もある)を、以下の動物実験に使用した。

- [0032] 実施例2:

実施例1における5M塩化カルシウム水溶液15  $\mu$  Lに代え、5M酢酸亜鉛水溶液15  $\mu$  Lを使用した他は、実施例1と同様の操作を行い、本発明のナノ粒子を製造した。

- [0033] 試験例1:皮膚/粘膜透過性試験

dB/dB雄性マウス、10週齢(体重40～46g)を使用し、1群3～4匹とし、マウスの背を電気バリカンで皮膚表面を傷つけないように剪毛して、実施例1の方法により得た本製剤(インスリン量:10  $\mu$  g)を背部に塗布し、経皮吸収させた。

経粘膜吸収を検討するため、他の一群のマウスをもちい、その鼻粘膜に、同様の本製剤(インスリン量:10  $\mu$  g)を噴霧し、粘膜吸収させた。

さらに他の群のマウスには、通常のインスリン(インスリン量:1  $\mu$  g)を皮下注射した。

さらにもう一群の3匹を無投与とし、コントロールとした。

- [0034] 各試験マウスについて、試験投与前、投与後1、2、4、5、6および7時間後毎に尾静脈から採血し、血糖値を、グルコカード ダイアメータ(アークレイ ファクトリイ社製)を使用して測定した。なお、インスリン皮下投与マウスについては、投与前、投与後15、40、60および80分後毎に尾静脈から採血し、血糖値を、グルコカード ダイアメ

ータを使用して測定した。

各マウスの投与前の血糖値レベルを100%とし、その血糖値の低下(%)を図1に示した。

なお、インスリン皮下投与は投与後80分までのデータである。

[0035] 試験例2:

試験例1で使用したマウスについて、本製剤を塗布した部分の皮膚を採取し、標本作製した。アリザリンSを用いてカルシウム染色し、本製剤の経皮吸収性を、カルシウムをマーカーとして検討した。

その結果、試験例1で使用したマウスにおいて本製剤を塗布した皮膚には、本製剤の経皮吸収性を認めるカルシウム染色の陽性が確認された。

[0036] 以上の試験例1の結果を示す図1から明らかなように、本製剤はマウスにおいて、本製剤を皮膚塗布および粘膜噴霧することにより、有意な血糖値の低下が観測され、その血糖値低下作用は持続性のものであった。

このことは、インスリンを含有するナノ粒子を有効成分とした本製剤を皮膚投与あるいは粘膜投与することで、良好にインスリンが生体内吸収され、血糖値を低下させていることを示すものである。また、その点は、試験例2の結果からも支持された。

したがって、インスリンを含有するナノ粒子を有効成分とした本製剤は、これまでの注射投与によるインスリン投与製剤に比較し、著しく患者にメリットがあるものであり、臨床上極めて有効なものである。

[0037] 実施例3:

ヒト成長ホルモン1mgを蒸留水100  $\mu$ Lに溶解し、この溶液に塩化亜鉛100  $\mu$ gを加え、攪拌後静置した。次いで2% Tween80水溶液100  $\mu$ Lを加え、攪拌した後、0.1~0.5mgのミスチン酸をアセトン100  $\mu$ Lに溶解した溶液を加え、さらに5分間攪拌することにより一次ナノ粒子を作製した。次に、0.5M塩化カルシウム水溶液30  $\mu$ Lを加え、30分間攪拌した。その後0.1M炭酸ナトリウム水溶液30  $\mu$ Lを加えて30分間攪拌することにより、ヒト成長ホルモンを含有する本発明のナノ粒子を作製した。

この溶液中に含まれるナノ粒子の粒径を光散乱法により測定したところ、大部分の

ナノ粒子の直径は10～90nmのものであった。特に、ミスチン酸を0.3mg添加した場合には、粒径が50nmのものが最も多く存在した。

[0038] 製剤例1:軟膏剤／ハイドロゲル剤

実施例1で得られた本発明のナノ粒子、白色ワセリン、カルボキシメチルセルロースナトリウムおよびパラオキシ安息香酸メチルの適量を取り、全量が均質になるまで混和し、軟膏剤およびハイドロゲル剤とした。

[0039] 製剤例2:外用貼付剤(水性パップ剤)

実施例1のナノ粒子	0.1重量部
ポリアクリル酸	2.0重量部
ポリアクリル酸ナトリウム	5.0重量部
カルボキシメチルセルロースナトリウム	2.0重量部
ゼラチン	2.0重量部
ポリビニルアルコール	0.5重量部
グリセリン	25.0重量部
カオリン	1.0重量部
水酸化アルミニウム	0.6重量部
酒石酸	0.4重量部
EDTA-2-ナトリウム	0.1重量部
精製水	残 部

上記成分配合をベースとし、常法により外用貼付剤(水性パップ剤)を得た。

産業上の利用可能性

[0040] 以上記載のように、本発明は生理活性タンパク質またはペプチドを水不溶体とし、当該水不溶体、疎水基と陰イオン残基を併せもつ中鎖有機化合物および界面活性剤を用いて一次ナノ粒子とし、次いで、当該一次ナノ粒子を2価または3価の金属塩、および2価または3価の塩基性塩と順次接触させることにより得られる生理活性タンパク質またはペプチドを含有するナノ粒子である。当該本発明のナノ粒子は、そこに含有される生理活性タンパク質またはペプチドを皮膚または粘膜経路により生体内吸収させるものであり、注射投与に代わり得る生体内吸収性を示すものである。し

たがって、これまで達成されていなかった生理活性タンパク質またはペプチドの経皮または経粘膜による生体内吸収を可能にする画期的な効果を有し、生理活性タンパク質およびペプチドを含有する高吸収性の外用剤が創製され、医療上の価値は多大なものである。

## 請求の範囲

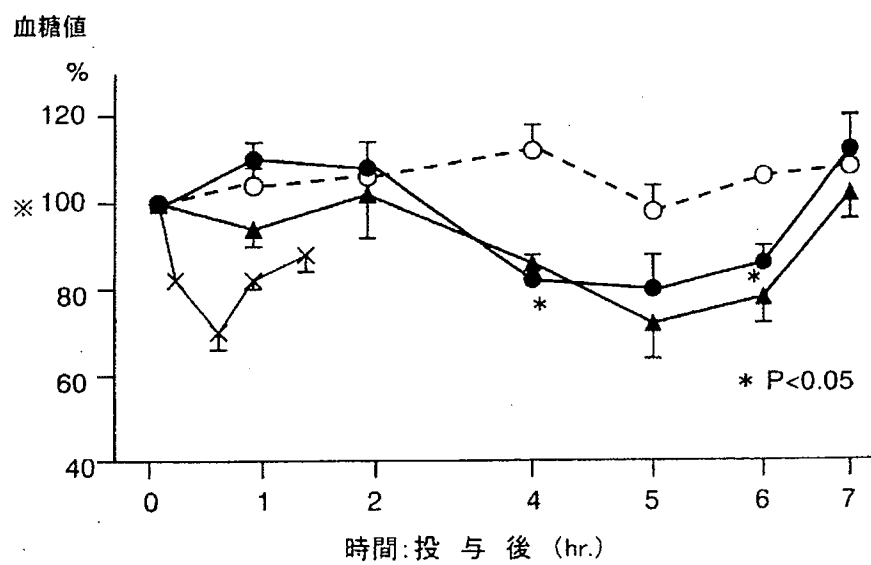
- [1] 生理活性タンパク質またはペプチドを水不溶体とし、当該水不溶体、疎水基と陰イオン残基を併せもつ中長鎖有機化合物および界面活性剤を用いて一次ナノ粒子を作製し、当該一次ナノ粒子を2価または3価の金属塩、および2価または3価の塩基性塩と順次接触させることにより得られる生理活性タンパク質またはペプチドを含有するナノ粒子。
- [2] 一次ナノ粒子が、水不溶体、疎水基と陰イオン残基を併せもつ中長鎖有機化合物および界面活性剤を有機溶媒または含水有機溶媒に溶解または懸濁し、これを多量の水に分散しながら加えることにより作製されるものである請求項1に記載のナノ粒子。
- [3] 粒子の直径が1〜150nmである請求項1または2に記載のナノ粒子。
- [4] 粒子の直径が10〜80nmである請求項1または2に記載のナノ粒子。
- [5] 生理活性タンパク質またはペプチドが、インスリン、インターフェロン $\alpha$ 、インターフェロン $\beta$ 、インターフェロン $\gamma$ 、成長ホルモン、G-CSF、GM-CSF、エリスロポエチン、トロンボポエチン、ウロキナーゼ、t-PA、IL-11、エタネルセプト、インフリキシマブ、SOD、FGF、EGF、HGF、NGF、BDNF、レプチン、NT-3、抗原、抗体、酵素、カルシトニン、PTH、ACTH、GnRH、TRHおよびバソプレシンから選択されるものである請求項1〜4のいずれかに記載のナノ粒子。
- [6] 生理活性タンパク質またはペプチドを水不溶体とする手段が、2価または3価の金属イオンとの接触、酸性または塩基性多糖体との接触、pHの調整またはイオン強度の変化のいずれかの手段である請求項1に記載のナノ粒子。
- [7] 生理活性タンパク質またはペプチドを水不溶体とするために接触させる2価または3価の金属イオンが、亜鉛イオン、カルシウムイオン、鉄イオンおよび銅イオンから選択されるものである請求項6に記載のナノ粒子。
- [8] 疎水基と陰イオン残基を併せもつ中長鎖有機化合物が、ミリスチン酸、オレイン酸、ラウリン酸、パルミチン酸およびそれらの塩から選択されるものである請求項1ないし4のいずれか1項に記載のナノ粒子。
- [9] 一次ナノ粒子に接触させる2価または3価の金属塩がカルシウム塩、亜鉛塩、鉄塩



または銅塩であり、2価または3価の塩基性塩が炭酸塩、リン酸塩、シュウ酸塩、乳酸塩または尿酸塩である請求項1ないし4のいずれか1項に記載のナノ粒子。

- [10] 請求項1ないし9のいずれか1項に記載のナノ粒子からなることを特徴とする皮膚または粘膜用外用剤。
- [11] 外用剤が、軟膏剤、ゲル剤、点鼻剤、点眼剤、噴霧剤、吸引剤、懸濁剤、パップ剤、貼付剤および口腔粘膜用錠剤から選択されるものである請求項10に記載の外用剤。
- [12] 生理活性タンパク質またはペプチドを水不溶体とし、当該水不溶体、疎水基と陰イオン残基を併せもつ中長鎖有機化合物および界面活性剤を有機溶媒または含水有機溶媒に溶解または懸濁し、この溶液を多量の水に分散しながら加えることにより一次ナノ粒子を作製し、当該一次ナノ粒子含有溶液に2価または3価の金属塩、および2価または3価の塩基性塩を順次加えることを特徴とする生理活性タンパク質またはペプチドを含有するナノ粒子の製造方法。
- [13] 生理活性タンパク質またはペプチドを水不溶体とする手段が2価または3価の金属イオンとの接触であり、一次ナノ粒子に接触させる2価または3価の金属塩がカルシウム塩であり、2価または3価の塩基性塩が炭酸塩である請求項12に記載のナノ粒子の製造方法。
- [14] 金属イオンが亜鉛イオンである請求項13に記載のナノ粒子の製造方法。

[図1]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/012718

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A61K38/00, 9/06, 9/10, 9/12, 9/14, 9/70, 9/72, 47/02, 47/04,  
47/12, 47/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61K38/00, 9/00, 47/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2001-518915 A (Novo Nordisk A/S), 16 October, 2001 (16.10.01), Full text; Claims; page 6, lines 8 to 10; page 7, lines 2 to 5; examples I to IV & WO 98/42367 A1 & AU 9866118 B & EP 969860 A1 & US 6043214 A	1-14
Y	JP 2001-518916 A (Novo Nordisk A/S), 16 October, 2001 (16.10.01), Full text; Claims; page 6, 5th line from the bottom to 2nd line from the bottom & WO 98/42368 A1 & AU 9866119 B & US 5898028 A & EP 971729 A1	1-14

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
30 November, 2004 (30.11.04)

Date of mailing of the international search report  
28 December, 2004 (28.12.04)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/012718

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2001-526634 A (Massachusetts Institute of Technology), 18 December, 2001 (18.12.01), Full text; Claims; page 15, the last line to page 16, line 6; example 12 & WO 98/31346 A1 & US 5855913 A & EP 954282 A1 & US 5985309 A & US 2002/52310 A & CA 2403349 A1 & US 2003/68277 A & US 2004/62718 A	1-14
Y	JP 61-91130 A (Monsanto Co.), 09 May, 1986 (09.05.86), Full text; Claims (1), (3), (38); examples 1 to 30 & EP 177478 A1 & AU 8548237 B & AU 8814390 B & US 5411951 A	1-14
Y	JP 2003-519651 A (BROWN UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION), 24 June, 2003 (24.06.03), Full text; Claims; example 14 & WO 01/51032 A2 & AU 2001/127902 B & EP 1246609 A2 & US 2003/82236 A & US 2003/104068 A	1-14
Y	MAA, Y. et al., 'Spray-drying of air-liquid interface sensitive recombinant human growth hormone.', J.Pharm.sci., (1998), Vol.87, No.2, pages 152 to 159, full text, table 1	1-14
Y	WO 02/11695 A2 (INHALE THERAPEUTIC SYSTEMS INC.), 14 February, 2002 (14.02.02), Full text; page 3, lines 16 to 20; example 7 & US 2002/65399 A & AU 2001/81113 B & EP 1309312 A2 & US 6569406 A & US 2003/190291 A & JP 2004-515467 A	1-14
Y	JP 53-107408 A (Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.), 19 September, 1978 (19.09.78), Full text; Claims; page 2, upper left column, line 14 to lower right column, line 11; example 8 & DE 2807248 A1 & FR 2381520 A1 & US 4156719 A & GB 1601613 A	1-14
Y	JP 3-275633 A (Teikoku Seiyaku Co., Ltd.), 06 December, 1991 (06.12.91), Full text; Claims; examples (Family: none)	1-14

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/012718

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 55-7228 A (Lion Hamigaki Kabushiki Kaisha), 19 January, 1980 (19.01.80), Full text; Claims; examples (Family: none)	1-14
Y	JP 55-17328 A (Tanabe Seiyaku Co., Ltd.), 06 February, 1980 (06.02.80), Full text; Claims; experimental example; examples (Family: none)	1-14
Y	JP 1-102029 A (Boehringer Ingelheim International GmbH.), 19 April, 1989 (19.04.89), Full text; Claims; page 3, lower right column, line 9 to page 4, upper left column, line 16; examples & EP 307857 A1                      & DE 3731255 A1 & AU 8822316 B                      & US 5266310 A	1-14
Y	JP 2002-348234 A (Proteck Co., Ltd.), 04 December, 2002 (04.12.02), Full text; Claims; Par. No. [0023]; examples; test examples & WO 02/96396 A1                      & EP 1398025 A1 & US 2004/185113 A	1-14

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))			
Int. Cl <sup>1</sup> A61K38/00, 9/06, 9/10, 9/12, 9/14, 9/70, 9/72, 47/02, 47/04, 47/12, 47/16			
B. 調査を行った分野			
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))			
Int. Cl <sup>1</sup> A61K38/00, 9/00, 47/00			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示		関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 2001-518915 A (ノボ ノルディスク アクティベールスカフ) 2001.10.16 文献全体、特許請求の範囲、p.6第8-10行、p.7第2-5行、例I-IV & WO 98/42367 A1 & AU 9866118 B & EP 969860 A1 & US 60 43214 A		1-14
Y	JP 2001-518916 A (ノボ ノルディスク アクティベールスカフ) 2001.10.16 文献全体、特許請求の範囲、p.6下から第5-2行 WO 98/42368 A1 & AU 9866119 B & US 5898028 A & EP 971729 A1		1-14
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 30.11.2004		国際調査報告の発送日 28.12.2004	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 大久保元浩	4C 8828
		電話番号 03-3581-1101	内線 3452

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 2001-526634 A (マサチューセッツ インスティテュート オブ テクノロジー) 2001.12.18 文献全体、特許請求の範囲、p.15最下行-p.16第6行、実施例12 & WO 98/31346 A1 & US 5855913 A & EP 954282 A1 & US 5985309 A & US 2002/52310 A & CA 2403349 A1 & US 20 03/68277 A & US 2004/62718 A	1-14
Y	JP 61-91130 A (モンサント コンパニー) 1986.05.09 文献全体、特許請 求の範囲(1), (3), (38)、例1-30 & EP 177478 A1 & AU 85482 37 B & AU 8814390 B & US 5411951 A	1-14
Y	JP 2003-519651 A (ブラウン エネルギー リサーチ ファウンデーション) 2003.06.24 文献全体、特許請求の範囲、実施例14 & WO 01/51032 A2 & AU 2001/127902 B & EP 1246609 A2 & US 2003/82236 A & US 2003/104068 A	1-14
Y	MAA, Y. et al. 'Spray-drying of air-liquid interface sensiti ve recombinant human growth hormone.' J. Pharm. sci., (199 8) vol.87 no.2 p.152-159 文献全体、Table 1	1-14
Y	WO 02/11695 A2 (INHALE THERAPEUTIC SYSTEMS INC) 2002.02.14 文献全体、p.3第16-20行、Example 7 & US 2002/65399 A & AU 2001/81113 B & EP 1309312 A2 & US 6569406 A & US 2003/190291 A & JP 2004-515467 A	1-14
Y	JP 53-107408 A (山之内製薬株式会社) 1978.09.19 文献全体、 特許請求の範囲、p.2左上欄第14行-右下欄第11行、実施例8 & DE 2807248 A1 & FR 2381520 A1 & US 4156719 A & GB 160 1613 A	1-14
Y	JP 3-275633 A (帝國製薬株式会社) 1991.12.06 文献全体、特 許請求の範囲、実施例 (ファミリーなし)	1-14
Y	JP 55-7228 A (ライオン歯磨株式会社) 1980.01.19 文献全体、特許 請求の範囲、実施例 (ファミリーなし)	1-14

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 55-17328 A (田辺製薬株式会社) 1980.02.06 文献全体、特 許請求の範囲、実験例・実施例 (ファミリーなし)	1-14
Y	JP 1-102029 A (ペーリンガー インゲルハイム インターナショナル ゲゼルシャフト ミット ベシ ュンクテル ハフツング) 1989.04.19 文献全体、特許請求の範囲、p.3右 下欄第9行-p.4左上欄第16行、実施例 & EP 307857 A1 & DE 3731255 A1 & AU 8822316 B & US 5266310 A	1-14
Y	JP 2002-348234 A (株式会社プロテック) 2002.12.04 文献全体、特 許請求の範囲、【0023】、実施例・試験例 & WO 02/96396 A1 & EP 1398025 A1 & US 2004/185113 A	1-14